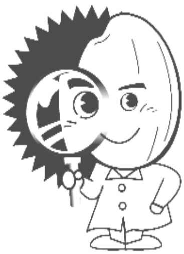
鑑定団シリーズ
コシヒカリ品種判別キット

研究用試薬

コシヒカリ鑑定団® ver. 2 取扱説明書

Cat No. 01-2020

ビジョンバイオ株式会社



キットの特徴

1. 本キットは、農林水産省モニタリング検査でNo.1の実績を誇る、400品種以上を相互識別可能な弊社独自開発の手法から、コシヒカリ判別に特化した検査試薬です※。

2. 本キットでは、“コシヒカリ新潟BL”も“コシヒカリ”として判定されます。

3. 平成24年度作付け上位10品種との明確な品種判別が可能です。

4. DNA抽出からPCRによるDNA増幅までの試薬が全てセットされています。

5. 最短2時間で結果判定を行うことが可能です。

6. 遠心分離機や恒温槽、有機溶媒を使用しない簡易抽出法を採用していますので、初心者でも安全かつ迅速にDNA抽出を行っていただけます。

7. 高速PCR試薬の新規採用により、従来の半分以下の時間でDNA増幅が完了します。

8. シングルPCRであるため、再現性が非常に高く、簡便な操作で結果判定まで行えます。

9. 検査手法としてマイクロサテライト法を採用しており、高精度で信頼性、再現性の高い結果が得られます。

注解および留意点

※）各県農業試験場のご協力のもと、各都道府県産のコシヒカリ原種や主要な品種について、同一パターンを示すことを確認しておりますが、遺伝的変異により異なるバンドパターンになる可能性があります。

品種別判定可否リスト（1）

平成24年産水稲の品種別作付割合上位20品種※			
順位	品種名	作付割合（%）	コシヒカリとの識別
1	コシヒカリ	37.5	-
2	ひとめぼれ	9.8	〇
3	ヒノヒカリ	9.5	〇
4	あきたこまち	7.3	〇
5	キヌヒカリ	3.1	〇
6	ななつぼし	3.0	〇
7	はえぬき	2.7	〇
8	まっしぐら	1.8	〇
9	きらら397	1.8	〇
10	あさひの夢	1.4	〇
11	つがるロマン	1.3	〇
12	こしいぶき	1.3	×
13	あいちのかおり	1.1	×
14	夢つくし	0.9	〇
15	ゆめぴりか	0.8	〇
16	彩のかがやき	0.8	〇
17	ハツシモ	0.6	〇
18	ハナエチゼン	0.6	〇
19	つや姫	0.6	×
20	きぬむすめ	0.5	×

※公益社団法人 米穀安定供給確保支援機構　情報部　平成25年7月1日

作付上位20品種を母集団とした場合、コシヒカリを対象とした識別が可能な品種の作付割合は約96%となります。また、本キットを使用した場合、コシヒカリを除く上位10品種全てとの識別が可能です。

品種別判定可否リスト（2）

コシヒカリと異なるパターンを示す品種例（上位20品種以外）			
あかね空	さとじまん	ほしのゆめ	吉備の華
あきげしき	たかねみのり	ほほほの穂	月の光
アキニシキ	ちゅらひかり	まなむすめ	五百万石
あきほ	チヨニシキ	むつほまれ	初星
あきろまん	どんとこい	めんこいな	森のくまさん
アケボノ	てんこもり	ゆきの精	中生新千本
イクヒカリ	てんたかく	ゆめあかり	朝の光
いわてっこ	能登ひかり	ユメヒカリ	朝日
かりの舞	ハツシモ	ゆめひたち	日本晴
元気つくし	フクヒカリ	ゆめみのり	美山錦
コガネマサリ	ふさおとめ	葵の風	夢しずく
ゴロピカリ	ふさこがね	黄金錦	山田錦

コシヒカリと同じパターンを示す品種例　（上位20品種以外）			
ササニシキ	にこまる	ミネアサヒ	ミルキークイーン

構成品（30反応分）

品目		容量	数量
器具類	サンプリングスプーン	－	30本
試薬類	DNA抽出試薬	1.5mL	30本
	ポジティブコントロール溶液	0.2mL	1本
	PCRプレミックスチューブ	－	30本

その他必要な機器・試薬

・ミルサー
・PCRラック（0.2mLチューブ対応品）
・マイクロピペット（2-20μL用）
・ピペットチップ
・サーマルサイクラー
・電気泳動装置
・ゲル作製原料（染色試薬、バッファー、アガロース）
・UVトランスイルミネーター
・デジタルカメラゲル撮影装置

上記、機器・試薬類のご購入に関しまして、弊社にて取扱いを行っておりますので、お気軽にお問い合わせ下さい。

1. コシヒカリ鑑定団®
1－1. 分析試料の調製法（DNA抽出）

1. 分析試料（籾米・玄米・精白米）約50g をミルサーで約30秒間粉砕し、均質化処理を行い調製します※1）。

2. 付属のサンプリングスプーン（大サイズ面）で試料を**適量採取**し、DNA抽出試薬チューブに投入して下さい。その後、チューブのフタをしっかりと閉め、10回程度転倒混和（撹拌）させます。

サンプリングスプーン小サイズ面

使用不可 ×

サンプリングスプーン大サイズ面

使用可 ◎

＜サンプリング量について＞

試料形態	サンプリング目安量
精白米	サンプリングスプーン大サイズ面で**スリ切り3杯**
玄米・籾米	サンプリングスプーン大サイズ面で**スリ切り1杯**
炊飯米	炊飯米3粒程度（抽出液中で細かく粉砕）
葉（植物体）	5mm四方の生鮮葉切片（溶液中で軽くスリ潰し）

3. 約5分間静置し、上澄みをそのままPCR用試料とします。※2）

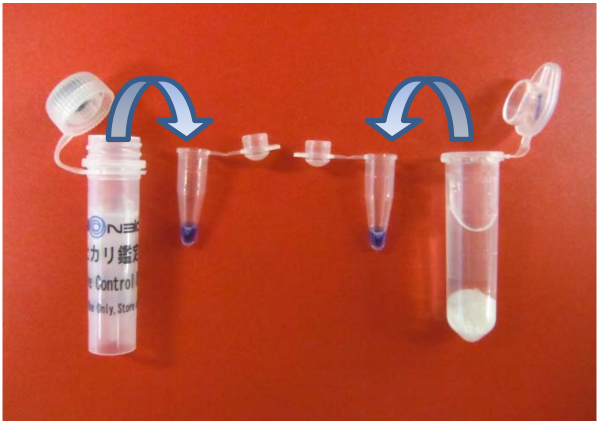
注解および留意点

※1） 過剰な微粉砕は行わないで下さい。DNA増幅不良を起こす原因となることがあります。

※2） 静置後の浮遊物過多（炊飯米等加工試料）によるPCR不良の場合は、遠心分離を行うことにより改善する場合がございます。

1. コシヒカリ鑑定団®
1－2. DNAの増幅（PCR法）

1. プレミックスPCRチューブを2本用意し、1本にポジティブコントロール溶液を**5.0μL**添加し、もう1本にPCR用試料溶液を**5.0μL**添加して下さい。

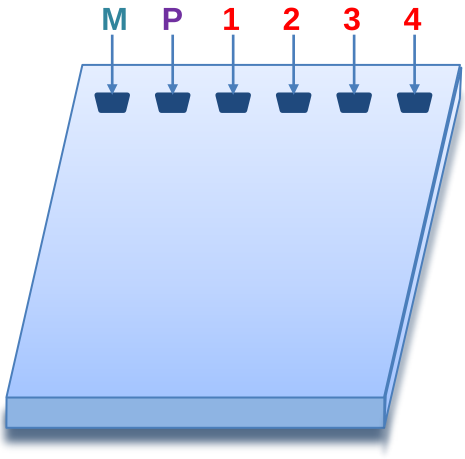


2. チューブの蓋をしっかりと閉め、下記の反応条件で高速PCR反応を行います。

Cycle（35cycles）			Hold
94℃	55℃	68℃	4℃
5 秒	1 秒	5 秒	∞

1. コシヒカリ鑑定団®
1－3. アガロースゲルによる電気泳動

（電気泳動参考例）



M： 100bp DNA ladder

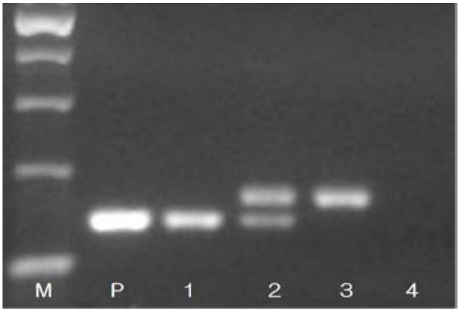
P： ポジティブコントロール

1：コシヒカリ100%

2：コシヒカリ＋異品種

3：異品種100%

4：ネガティブコントロール



注解および留意点

※1）DNA濃度が高い場合、バンドの位置が陽極側に移動する傾向があります。その際は、アプライ量を減らし、再度電気泳動を行ってください。
尚、通常は10μL程度をアプライの目安として下さい。

※2）目の保護のため、紫外光は決して直視せず、添付のカバーを通して観察してください。

※3）一般的なアガロースゲル電気泳動の場合、2.5% Agarose Gel（0.5×TBE buffer）で、100V定電圧、40～50分間の電気泳動を行ってください。

1. コシヒカリ鑑定団®
1－4. 解析・判別

1. キット添付のポジティブコントロールDNAと比較して判別いたします。

2. 試料のPCR産物とポジティブコントロールDNAのPCR産物が同じ長さのバンドパターンであれば、試料は、コシヒカリであると判別されます。

3. ポジティブコントロール（約150 bp ）よりも陰極側（約180 bp ）にバンドが検出された場合、異品種混入と判定されます。

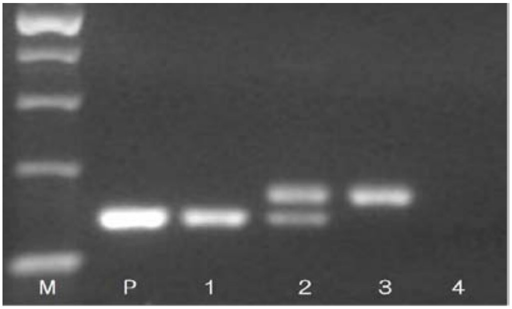


図1. 定性検査での異品種混入例
M: 100bp DNA ladder, P: positive control DNA（コシヒカリ）, 1：コシヒカリ100%, 2：コシヒカリ＋異品種, 3：異品種100%, 4：ネガティブコントロール

参考資料

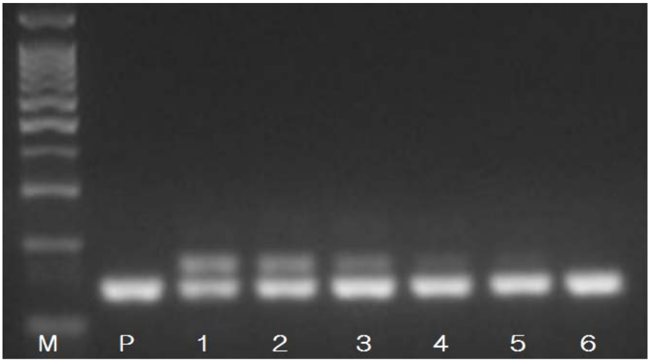
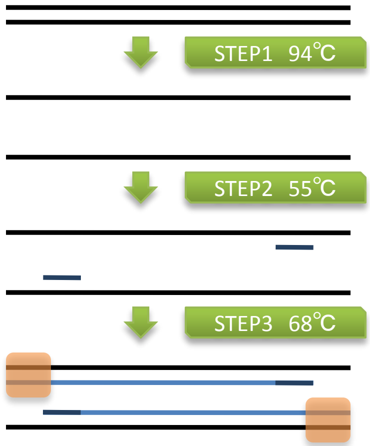


図4. 異品種混入検出感度(検出下限値5%)
M: 100bp DNA ladder, P: positive control DNA(コシヒカリ), 1: 20% 異品種混入, 2: 10% 異品種混入, 3: 5% 異品種混入, 4: 2% 異品種混入, 5: 1% 異品種混入, 6: 0% 異品種混入

検出原理

PCR（Polymerase Chain Reaction）法では、目的となるDNA領域の両端に相補的な20塩基程度のオリゴヌクレオチド（プライマー）を足がかりとし、DNAを合成する酵素（耐熱性DNAポリメラーゼ）によって、相補的な配列が伸長していきます。この反応は温度変化により制御することが可能で、3段階の温度変化により、特定のDNA領域が2倍になります。

1サイクル中の反応機構



STEP1 94℃

二本鎖DNAの熱変性

STEP2 55℃

プライマーとDNAが二本鎖を形成

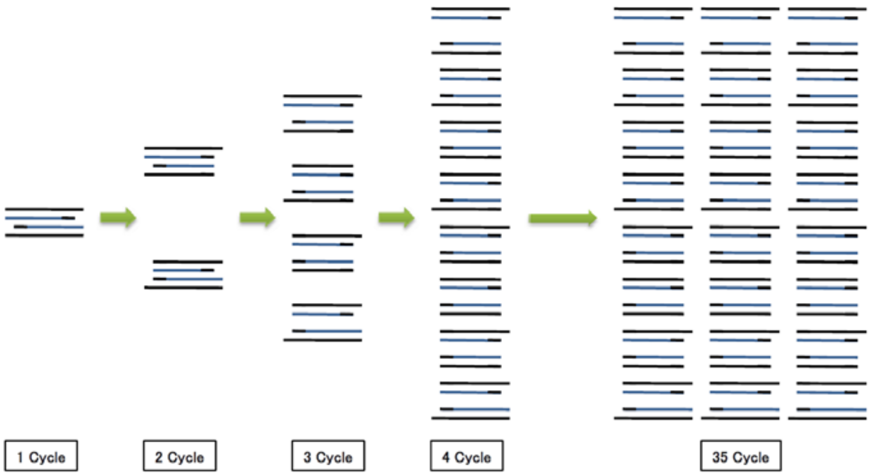
STEP3 68℃

耐熱性ポリメラーゼによる
DNA伸長反応

検出原理

前述の反応を1サイクルとし、35サイクル程度の酵素反応を繰り返すことにより、最終的には目的のDNA領域がおよそ百万倍にまで増幅します。

増幅過程の反応機構

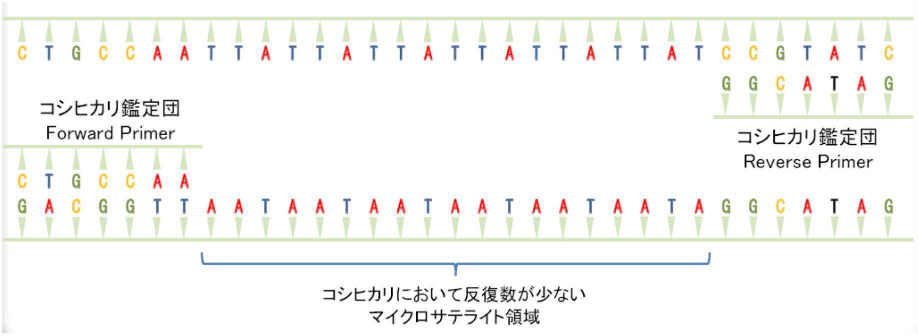


検出原理

マイクロサテライト（microsatellite）は、ゲノム上に存在する、数塩基の単位配列が数回から100回ほど反復した配列です。多型マーカーには、マイクロサテライト多型以外にも一塩基多型（SNP；Single Nucleotide Polymorphism）によるものなどがありますが、マイクロサテライト多型は、ゲノム中に広く散在しており、中立で共優性を示すことから、集団遺伝学やDNA鑑定のための遺伝マーカーとして重用されています。ヒトの個人識別にも同様の手法が用いられています。

マイクロサテライトは他の中立的な領域と比べて変異速度が高く、品種間であっても高い多型性を持つものがあります。本キットに含まれるプライマーセットは、数千のイネマイクロサテライトの中から、コシヒカリにおいて反復数が少ない特徴を持つマイクロサテライトの両端から設計したもので、このプライマーを用いたPCR増幅により、コシヒカリを判別することができます。

検出原理（イメージ図）



使用上または取扱上の注意

1. 有効期限の過ぎたキットは使用しないで下さい。

2. ロットの異なる試薬や本キット以外の試薬を組み合わせて使用しないで下さい。

キットの保存条件および有効期限

構成品	保存条件	有効期限
DNA抽出試薬	15～25℃	6ヶ月
ポジティブコントロール溶液	－20℃	
PCRプレミックスチューブ		

保証

1. 本キットを使用して得られた結果の評価および利用は、お客様の責任と判断において行ってください。

2. 測定結果を利用し、その結果生じた損害および損失については、当社は一切保証を負いません。

3. 本キット以外の試薬、または原材料を使用されて得られた結果については、当社は一切保証いたしません。

4. 万一、試薬に品質上の瑕疵があると当社が判断した場合、新しい製品とお取替えいたします。

製品の技術的なお問い合わせは、

ビジョンバイオ株式会社

〒839-0864　福岡県久留米市百年公園1-1
久留米リサーチセンタービル

Tel : (0942)36-3100　Fax : (0942)36-3101

URL : http://www.visionbio.co.jp

E-mail : info@visionbio.com